

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791795

研究課題名(和文)腎細胞癌における新規VHL関連蛋白の発見とその分子間相互作用と細胞応答の究明

研究課題名(英文)Interaction of molecules with VHL-signaling pathway in renal cell carcinoma

研究代表者

吉田 毅 (YOSHIDA, Takeshi)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：30596648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：腎細胞癌では、VHL-HIF とその下流遺伝子のシグナル伝達経路の異常が腎細胞癌の血管新生・増殖のメカニズムの一つと考えられている。我々は、EMT関連蛋白Twist 分子に注目し、VHL-HIF と下流遺伝子のシグナル伝達経路にどのような影響を与えているか検討した。

プロモーターアッセイでは、Twist蛋白を強発現させるとHIF結合モチーフを組み込んだプロモーター活性が上昇した。ChIPアッセイ、Gel ShiftアッセイにてTwistがVEGFプロモーター領域に結合していることが分かった。これらの結果は、TwistはVHL-HIF経路に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on Twist, which is involved in EMT (epithelial-mesenchymal transition) and demonstrated its effect on VHL-HIF signaling pathway.

Transcriptional activity of VEGF by Twist was measured by reporter assay using HIF responsive element (HRE) reporter plasmids co-transfected with Twist expression plasmid. Overexpressed Twist activated HRE reporter activity. VEGF promoter activity was activated by Twist in hypoxia. Binding of Twist to VEGF promoter in tumor cells were shown by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay using antibody against Twist. ChIP assay showed Twist binding to VEGF promoter. Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) were demonstrated to show binding of Twist for specific sequence (about -1000bp upstream from start point of transcription) in VEGF promoter.

These data suggest that Twist expression involves in tumor vascularization in renal tumor.

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：外科系 泌尿器科

キーワード：VHL HIF Twist EMT 腎細胞癌

1. 研究開始当初の背景

近年、腎細胞癌に対する血管内皮細胞増殖因子 VEGFR を阻害する分子標的薬が開発され転移性腎細胞癌の治療効果に改善が見られるようになった。しかしながら分子標的薬による治療に抗する症例もあり完全に治癒させることは困難である。VHL-HIF 経路に関わる未知の因子がまだ多く存在することが要因の一つと推測され、これを解明することが期待されている。

2. 研究の目的

腎細胞癌では染色体異常と転写抑制遺伝子 VHL の遺伝子異常、VHL-HIF とその下流遺伝子のシグナル伝達経路において HIF の標的遺伝子である VEGF の発現異常が腎細胞癌の血管新生、増殖のメカニズムの一つと考えられているが、不明な点が未だ多く VHL-HIF とその下流遺伝子のシグナル伝達経路に関わる未知の因子がまだ多く存在すると推測される。Twist は EMT(epithelial mesenchymal transition)のマーカーで癌細胞における浸潤や転移に関与している。また、HIF と同様に bHLH(basic helix-loop-helix)ファミリーに属している転写因子であり他の bHLH ファミリーと二量体を形成して遺伝子のプロモーター領域にある E-box 配列(CANNTG)に結合して下流遺伝子の転写調節を行う。本研究課題は、このような癌細胞で発現している転写因子 Twist 分子に注目し、この分子の癌細胞内での発現が VHL-HIF と下流遺伝子のシグナル伝達経路にどのような影響を与えるかを解明し腫瘍マーカーや予後規定因子としての可能性を探り、臨床応用できるか可能性を探るものである。

3. 研究の方法

(1)レポーターアッセイ: Twist 発現ベクターと HRE(HIF-responsive element)を持ったレポーターベクターを共発現させ、Twist の発現により低酸素下における HRE レポーターベクターの転写活性の変化を確認した。

(2)VEGF のプロモーターベクターにおいても低酸素下における Twist による転写活性の変化を確認した。さらに VEGF 欠損変異プロモーターベクターを用いて Twist が VEGF プロモーター領域に結合して転写活性を変化させる部位を特定した。

(3) ChIP アッセイ: Twist 抗体を用いてクロマチン免疫沈降法(ChIP)を行い、*in vivo* における Twist 分子が VEGF プロモーター領域に結合していることを確認した。

(4)Gel shift アッセイ: レポーターアッセイと ChIP アッセイの結果より、Twist が結合する領域の配列を持つ DNA oligonucleotide を作成し、精製した GST-Twist 蛋白を DNA

oligonucleotide に混ぜ電気泳動をかけることにより *in vitro* において Twist が VEGF プロモーター配列に結合するか確認した。

(5)腎細胞癌に対して摘出された病理組織を用いて免疫組織化学染色を行い、腎細胞癌における Twist の発現を確認した。

4. 研究成果

VHL は転写因子 HIF の分解制御を行っており、通常酸素下では VHL は HIF をユビキチン化して HIF を分解し下流遺伝子の転写活性を抑制する方向に働く。固形癌の中心部や癌細胞の活発に分裂増殖を起こしているような低酸素下状態になると、VHL は HIF と分離し HIF 自体が分解されなくなり安定化するため下流遺伝子の転写部位(HRE)に結合することにより下流遺伝子の転写活性を活性化させる(Fig. 1)。

本研究課題では、この VHL-HIF とその下流遺伝子シグナル伝達経路において、Twist の存在が HIF の転写活性に影響しているかを以下の通りに明らかにすることができた。

プロモーターアッセイにより、腎癌培養細胞株に HIF 結合エレメント(HRE)を組み込んだレポーターベクター(Luc-HRE)を Twist 発現ベクターと Co-transfection させると、レポーター活性が亢進した(Fig. 2(a))。この活性は低酸素状態起こす CoCl₂ を暴露させたときに特に更新した。他研究施設より供与された VEGF プロモーターベクターを用いて Twist 発現ベクターを強発現させると、同様にプロモーター活性が上昇した(Fig. 2(b))。また VEGF プロモーター欠損変異ベクターを用いて、VEGF プロモーター領域の Twist による活性の変化部位を確認した(Fig. 2(c))。

レポーターアッセイの結果より Twist による VEGF の転写活性が変化する領域に、実際に培養細胞内で Twist が結合していることを ChIP アッセイにより確認した。Twist が低酸素状況下で HIF と同じ領域に結合していることを *in vivo* において確認することができた(Fig. 3)。

GST-Twist 精製タンパク質が、VEGF プロモーター領域の配列を持つ二重鎖オリゴヌクレオチドに結合することを Gel shift アッセイにより確認した(Fig. 4)。 *in vitro* における結合が確認できた。

腎細胞癌に対して摘出された病理組織を用いて免疫組織化学染色を行い、腎細胞癌において Twist が高発現していることを確認することができた。

<得られた成果の国内外における位置づけとインパクト>

これまで腎細胞癌に対する VEGF を阻害する分子標的薬が開発されたが、一時的な効果は認めるものの分子標的薬に耐性となる症例がほとんどである。これは VHL-HIF 経路に関わる未知の因子がまだ多く存在する

ことが要因の一つと推測される。

本研究において、我々は、癌細胞の転移や浸潤、癌細胞の悪性度に関するメカニズム EMT(Epithelial-Mesenchymal transition) のマーカーである Twist に着目し、VHL-HIF とその下流遺伝子シグナル伝達経路において Twist の存在が HIF による VEGF の転写活性を調節していることを解明した。

VHL-HIF シグナル伝達に対する Twist の影響を示した我々の実験結果は、未だ報告されておらず、今回の結果により腎細胞癌の低酸素下におけるシグナル伝達のメカニズムに新たな機序を加えることができた。また腎細胞癌だけでなくその他の細胞においても、低酸素下において Twist が関与していることが示唆され、新たな研究や治療法へ足がかりになると期待される。これは Twist の発現は腎細胞癌のバイオマーカーになる可能性があること、癌組織における血管新生を阻害する分子標的薬になりうることを示している。

Fig.1

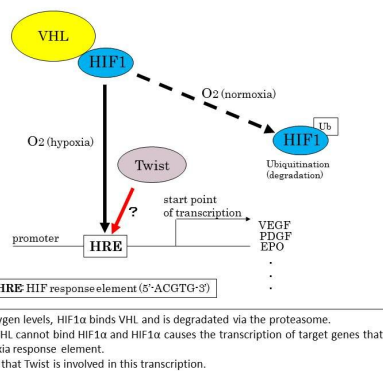
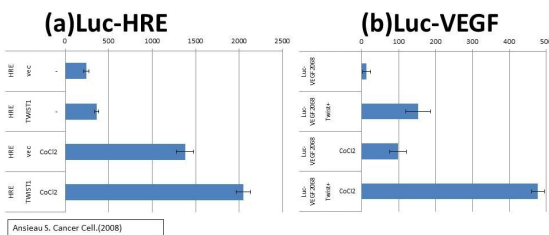
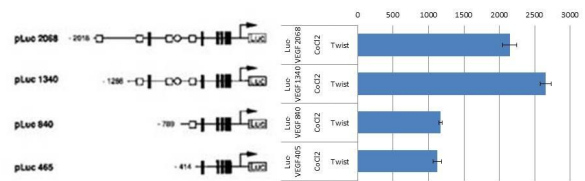


Fig. 2 reporter assay



(a) Twist expression upregulated promoter activity of HRE(HIF-responsive element) reporter plasmid in hypoxia (exposed with cobalt chloride (CoCl2) which is a chemical inducer of hypoxia-like responses).
 (b) VEGF promoter (-2088-) activity was up-regulated by Twist in hypoxic condition (exposed with CoCl2).

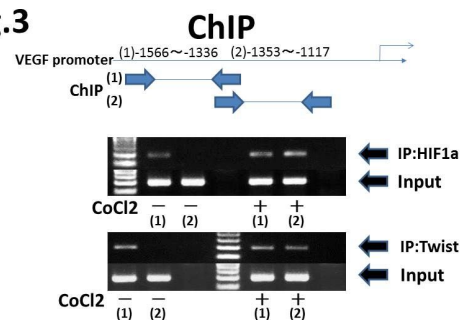
Fig. 2 (c) Luc-VEGF (deletion)



Gunter F, Oncogene (1997)

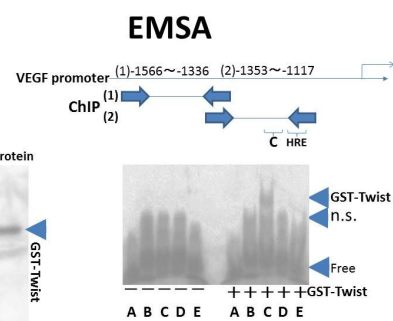
(c) VEGF promoter deletion mutant reporter plasmids were co-transfected with Twist expression plasmid exposed with CoCl2. Twist regulates VEGF promoter activity binding to VEGF promoter especially between -1256 to -789 upper stream from transcription start site.

Fig.3



Cell culture was exposed with cobalt chloride (CoCl2) which is a chemical inducer of hypoxia-like responses. Immunoprecipitation was performed using anti-Twist and -HIF1a antibodies and PCR reaction was performed using primer coded in target DNA. ChIP assay showed that Twist is bound to same region (2) with HIF1a in hypoxic condition.

Fig.4



Double strand oligonucleotides(A~E: 20mer) coded in VEGF promoter were mixed with purified GST-Twist protein and electrophoresed in TBE-PAGE gel. The result show that in hypoxic condition Twist protein bind the sequence C coded in VEGF promoter.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

現在投稿中

〔学会発表〕(計 4 件)

Takeshi Yoshida, Ryoichi Hamasuna, Naohiro Fujimoto, Tetsuro Matsumoto

Twist up-regulates VEGF expression with

HIF in hypoxia
109th Annual Meeting of the American
Urological Association
2014年5月18日(Orlando, USA)

吉田 毅、浜砂良一、藤本直浩、松本哲朗
腎癌におけるVHL-HIF経路に対するTwistの
関与の検討
第102回泌尿器科学会総会
2014年4月25日(神戸国際会議場)

Takeshi Yoshida, Ryoichi Hamasuna,
Naohiro Fujimoto, Tetsuro Matsumoto
Three cases of Plasmacytoid variant of
Bladder tumor
30th Korea-Japan Urological Congress
2013年9月7日(Seoul, Korea)

吉田 毅、浜砂良一、藤本直浩、松本哲朗
腎細胞癌のサブタイプにおけるEMTマーカー
の発現の検討
第101回泌尿器科学会総会
2013年4月27日(ロイトン札幌)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 毅 (YOSHIDA Takeshi)
産業医科大学医学部泌尿器科 助教
研究者番号: 30596648

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし